Aus dem Röntgeninstitut der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. A. Liechti
und dem
Physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. A. von Muralt.
Arbeit unter Leitung von Pd. Dr. W. Wilbrandt.

Untersuchungen über Ultravioletthæmolyse

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der Universität Bern

vorgelegt von

Jakob Leu
von Emmenbrücke (Luzern).

Sonderabdruck aus „Strahlentherapie" 71. Band (1942)

Auf Antrag des Herrn Prof. Dr. Liechti von der medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 8. Dezember 1943.

Der Dekan der medizinischen Fakultät:
E. Glanzmann

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus „**Strahlentherapie**“ 71. Band (1942)
Mitteilungen aus dem Gebiete der Behandlung mit Röntgenstrahlen und radioaktiven Substanzen, Licht und Kurzwellen
Zeitschrift der Deutschen Röntgengesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Lichtforschung
Verlag von Urban & Schwarzenberg in Berlin und Wien

Aus dem Röntgeninstitut der Universität zu Bern (Direktor: Prof. Dr. A. Liechti) und dem Physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern (Direktor: Prof. Dr. A. von Muralt)

Untersuchungen über Strahlenhämolyse

3. Mitteilung: Ultravioletthämolyse

Von

J. Leu, W. Wilbrandt und **A. Liechti**

Mit 10 Bildern

I. Einleitung

Bestrahlt man Blut mit hohen Dosen ultravioletter Strahlen, so tritt eine Hämolyse ein (Brooks 1919, Koeppe 1926, Giaume und Poulon 1929). Die Hämolyse wird von Koeppe und von Giaume und Poulon darauf zurückgeführt, daß die Bestrahlung eine Substanz freisetzt, die hämolytisch wirkt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Ultravioletthämolyse im Anschluß an eine Untersuchung der Röntgenhämolyse, die in zwei Mitteilungen (Liechti und Wilbrandt 1941, Bühlmann, Liechti und Wilbrandt 1942) beschrieben wurde und deren Ergebnis kurz folgendermaßen zusammengefaßt werden kann.

Die Röntgenhämolyse ist eine osmotische Hämolyse, die auf Grund einer Permeabilitätsänderung der Zellmembran zustande kommt. Die Membran wird durchlässig für Kationen. Auf Grund des Donnanmechanismus tritt Salz in die Zelle ein, wodurch eine bis zur Hämolyse führende osmotische Schwellung ausgelöst wird. Der Grad der Kationenpermeabilität und damit die Schwellungsgeschwindigkeit nimmt mit der Strahlendosis zu.

Die Schwellungsgeschwindigkeit hängt außerdem in ausgesprochener Weise von der Art der während der Nachperiode anwesenden Anionen ab, die in folgender Reihenfolge die Schwellung beschleunigen: $SO_4 < Cl < J < NO_3 < SCN <$ Salizylat. Diese Anionenwirkung beruht auf einer Beeinflussung der Kationenpermeabilität und nicht auf der Geschwindigkeit des Anioneneintritts in die Zellen; denn der limitierende Faktor für die Schwellungsgeschwindigkeit ist die Kationenpermeabilität.

Die Wirkung der Kationen selbst dagegen ist hauptsächlich in ihrer Diffusionsgeschwindigkeit durch die Membran begründet, die der Reihe K>Na>Li>Ba>Mg folgt.

Beide Ionenarten üben ihre Wirkung praktisch nur in der Nachperiode aus. Die während der Bestrahlung anwesenden Ionen haben keinen nachweisbaren Einfluß auf das Bestrahlungsresultat. Es beruht daher die Ionenwirkung nicht auf Sensibilisierung der Zellen gegen die Strahlenwirkung. Dagegen bestehen Gründe für die Annahme, daß umgekehrt die Strahlenwirkung nur auf einer Sensibilisierung der Membran gegen Anionen beruht. Erstens bewirken nämlich die Anionen die gleiche Permeabilitätsänderung auch am unbestrahlten Erythrozyten, nur erheblich schwächer, und zweitens wurde ein Anion gefunden, in dessen Lösung trotz Bestrahlung keine Permeabilitätsänderung und daher auch gar keine Hämolyse eintritt, nämlich das Sulfat.

Der Anionenwirkung geht vermutlich eine Adsorption der Anionen voraus, die bezüglich der adsorbierten Menge einen negativen Temperaturkoeffizienten hat. Daher ist die Schwellungsgeschwindigkeit bei 5° C höher als bei 20° C. Bei mittleren Temperaturen um 20° C liegt ein Minimum der Schwellungsgeschwindigkeit, die bei höheren Temperaturen wieder zunimmt und bei 37° beträchtlich größer ist als bei 20° C.

Die unmittelbare Wirkung der Anionen ist wahrscheinlich eine Denaturierung von Membraneiweiß. Dafür spricht, daß die hämolytisch wirksamsten Anionen (Rhodanid, Salizylat) bekanntermaßen Eiweiß denaturieren, ferner, daß die denaturierende Wirkung des Salizylats reversibel ist und daß dasselbe für die Wirkung auf die Zellpermeabilität gezeigt werden kann. Ferner ist eine eiweißdenaturierende Wirkung der Röntgenstrahlen aus Versuchen in vitro mit Dunkelfeldbeobachtung von Eiweißlösungen (Rajewsky) wahrscheinlich geworden, und schließlich bewirken alle bisher geprüften anderen Eiweißdenaturantien (Säure, Alkali, Alkohol, Äther, Azeton, Chloroform und Hitze) ebenfalls eine kolloidosmotische Hämolyse.

Der beschriebene Mechanismus der Hämolyse wird durch die Bestrahlung selbst ausgelöst und nicht von einem durch die Bestrahlung gebildeten oder freigesetzten hämolysierenden Stoff.

Soweit die Analyse der Röntgenhämolyse.

Nach den gleichen Gesichtspunkten beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Ultravioletthämolyse. Ihre Ergebnisse zeigen eine so weitgehende Übereinstimmung mit der Röntgenhämolyse in allen ebenerwähnten Punkten, daß ein gemeinsamer Mechanismus der beiden Hämolysen als bewiesen betrachtet werden kann.

II. Methodik

Das experimentelle Verfahren war in allen Einzelheiten, ausgenommen die Bestrahlung, gleich wie in der zweiten Mitteilung über Röntgenhämolyse (Bühlmann, Liechti und Wilbrandt 1942). Die Bestrahlung erfolgte folgendermaßen: Rinderblut wurde im Verhältnis 1:3 in Salzlösung suspendiert, dann in einer Quarzküvette von 5 mm Schichtdicke der Bestrahlung ausgesetzt und während der Expositionszeit fortlaufend mit Hilfe eines Rührwerkes gemischt. Als Strahlenquelle diente eine Quecksilberdampflampe (Hanau SR 300), die im Abstand von 20 cm aufgestellt war. Zwischen Strahlenquelle und Quarzküvette befand sich eine von kaltem Wasser kontinuierlich durchströmte, beidseitig mit Quarzfenstern abgeschlossene, 10,5 cm lange Kühlküvette aus Kupfer. Die Bestrahlungszeiten der einzelnen Versuche sind jeweilen bei den Abbildungen angegeben.

Nach der Bestrahlung wurde die Suspension auf verschiedene Lösungen verteilt, wobei sie nochmals im Verhältnis 1:10 verdünnt wurde. Die so erhaltenen verdünnten Suspensionen wurden bei 6° C aufbewahrt und ihre osmotische Resistenz (je 0,4 cm^3 in 5 cm^3 Kochsalzlösung) photometrisch verfolgt (Methode siehe Wilbrandt 1938). Wenn bei Versuchen das hier beschriebene Vorgehen etwas modifiziert werden mußte, so findet sich im Text oder bei der Abbildung ein entsprechender Vermerk.

Es erwies sich wegen der höheren Strahlenabsorption des Vollblutes als nötig, die Bestrahlung in verdünnter Suspension (25proz.) vorzunehmen, im Gegensatz zu den obenerwähnten Versuchen mit Röntgenstrahlen, bei denen Vollblut bestrahlt worden war. Um die dadurch bedingte stärkere Verdünnung des Blutes bei der photometrischen Bestimmung zu kompensieren, wurde mit größerem Abstand, nämlich 16 cm, zwischen Küvette und Photozelle gearbeitet (betr. die Abhängigkeit der Empfindlichkeit von diesem Abstand vgl. Wilbrandt 1938 sowie Steinmann und Wilbrandt 1942).

III. Experimentelle Ergebnisse

1. Die osmotische Natur der Hämolyse

Die Untersuchung der osmotischen Resistenz nach Ultraviolettbestrahlung zeigt den gleichen Typ der Resistenzänderung wie nach der Röntgenbestrahlung: Verschiebung der Kurven nach der Seite der höheren Konzentrationen, meist mit Abschrägung des steilen Kurventeils, d. h. Verbreiterung des hämolytischen Gebietes, und gelegentlich mit Hebung des unteren Kurventeils im nichthämolytischen Gebiet (Bild 1). Dem entspricht eine osmotische Hämolyse mit einer gewissen

Streubreite der Schwellungsgeschwindigkeit und gelegentlich einer Komponente nichtosmotischer Hämolyse (Liechti und Wilbrandt 1941). Auf die Streubreite wird in der Diskussion nochmals zurückzukommen sein. Die Ultravioletthämolyse kommt also ebenfalls wie die

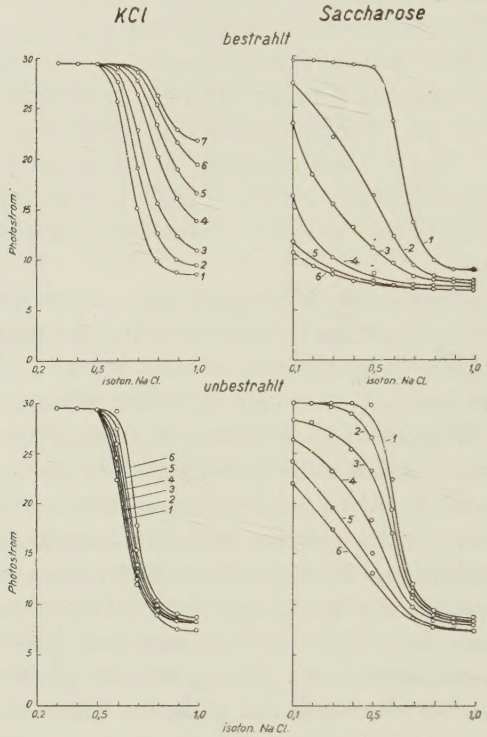

Bild 1. Osmotische Natur der Ultravioletthämolyse: Änderung der osmotischen Resistenz unbestrahlten und bestrahlten Blutes (2stündige Bestrahlung), in isotonischer Kaliumchlorid- und Saccharoselösung suspendiert:

a) unbestrahlt, suspendiert in isotonischer Kaliumchloridlösung
b) bestrahlt, suspendiert in isotonischer Kaliumchloridlösung
c) unbestrahlt, suspendiert in isotonischer Saccharoselösung
d) bestrahlt, suspendiert in isotonischer Saccharoselösung

Zeiten: Kurve Nr.	1	2	3	4	5	6	7	
	1	10	24	58	96	140	179	Stunden

Röntgenhämolyse im wesentlichen durch Aufhebung der selektiven Undurchlässigkeit für Kationen zustande.

Wie bei der Röntgenbestrahlung kommt es auch hier nicht zur Durchlässigkeit für Saccharose. In Saccharoselösung bleibt die osmotische Schwellung und die Hämolyse aus. Dagegen wird die durch Salzaustritt

bedingte osmotische Schrumpfung, die in Saccharoselösung schon beim unbestrahlten Blut (Bild 1c) eintritt (Davson 1939, Wilbrandt 1940), ebenso wie durch Röntgenbestrahlung auch durch Ultraviolettbestrahlung beschleunigt (Bild 1d). Auch hier läßt sich also eine Permeabilitätsänderung im Sinne gesteigerter Kationenpermeabilität nachweisen. Eine nichtosmotische Komponente, die bei der Verbreiterung des nichthämolytischen Kurventeils deutlich werden müßte, wird auch hier trotz 140stündiger Versuchsdauer nicht beobachtet. Die Deutung der schrägen

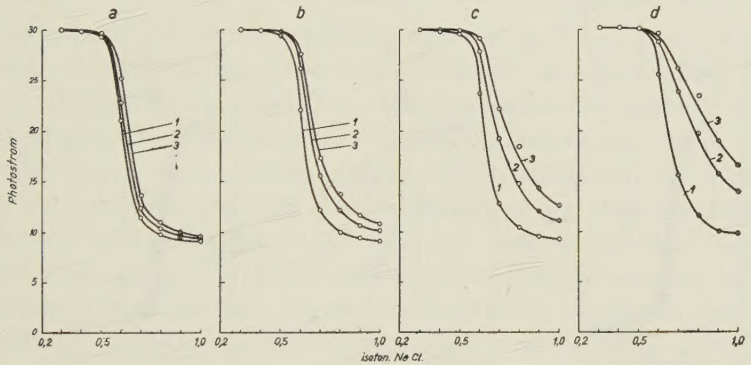

Bild 2. Abhängigkeit von der Strahlendosis. Änderung der osmotischen Resistenzkurven von vier Blutsuspensionen, die 0 Stunden (a), $^1/_2$ Stunde (b), 1 Stunde (c) und $2^1/_2$ Stunden (d) bestrahlt worden waren:

Zeiten:	Kurve Nr.	1	2	3	
		0	20	40	Stunden

Kurvenverzerrung als Ausdruck der Streuung der Schwellungsgeschwindigkeit (und nicht etwa als Folge einer nichtosmotischen Komponente der Hämolyse) bestätigt sich dadurch weiter, zumal die Abschrägung auch bei der Resistenzverschiebung nach links in Saccharoselösung sehr deutlich zu sehen ist.

2. Die Abhängigkeit von der Strahlendosis

Variiert man die Strahlendosis, so bleibt die Form der Resistenzänderung gleich. Es ändert sich nur ihre Geschwindigkeit. Das zeigt Bild 2, in dem die Resistenzkurven von 4 Blutsuspensionen wiedergegeben sind, die 0 Stunden (Bild 2a), $^1/_2$ Stunde (Bild 2b), 1 Stunde (Bild 2c) und $2^1/_2$ Stunden (Bild 2d) bestrahlt worden waren. Mit steigender Strahlendosis werden also zunehmende Grade von Kationenpermeabilität ausgelöst.

3. Der Mechanismus der Permeabilitätsänderung (Die Frage eines Hämolysins)

Nach den Angaben von Koeppe und von Giaume und Poulon soll die Ultravioletthämolyse auf der Bildung eines hämolysierenden Stoffes beruhen, der durch die Bestrahlung im Blute freigesetzt wird. Das steht zunächst nicht im Widerspruch mit unserem Befund der osmotischen Natur der Hämolyse, da es zahlreiche stofflich ausgelöste Hämolysen gibt, die auf Kationenpermeabilität beruhen (Wilbrandt 1941). Der Versuch, einen solchen hämolysierenden Stoff in bestrahltem Blut mit der hier verwendeten Methode nachzuweisen, ist uns aber nie gelungen.

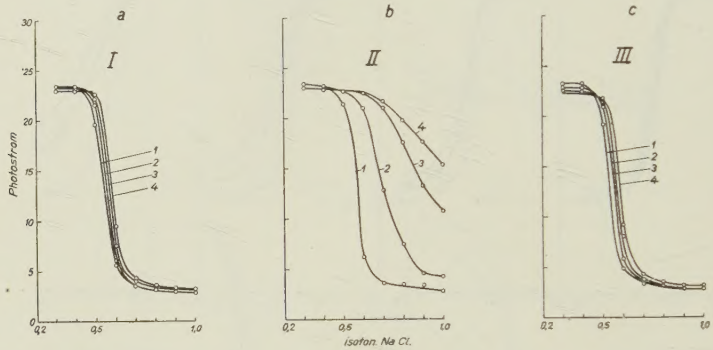

Bild 3. Versuch eines Hämolysinnachweises:

Suspension I: Resistenzkurven unbestrahlten Blutes nach steigenden Zeiten.
Suspension II: Resistenzkurven bestrahlten Blutes (1stündige Bestrahlung) nach steigenden Zeiten.
Suspension III: Resistenzkurven unbestrahlten Blutes, suspendiert in Zentrifugat, das aus Suspension II gewonnen wurde.

Zeiten:	Kurve Nr. 1	2	3	4	
	0	19	57	86	Stunden

Es wurde dabei folgendermaßen vorgegangen: Eine 10proz. Blutsuspension in isotonischer Kaliumchloridlösung wurde mit einer Strahlenmenge bestrahlt, die kräftig hämolysierend wirkt. Einige Zeit nach der Bestrahlung wurde ein Teil dieser Suspension zentrifugiert und die überstehende Lösung abgesogen. In dieser wurde das zentrifugierte, bestrahlte Blut durch eine entsprechende Menge frischen, unbestrahlten Blutes ersetzt (Suspension III). Die osmotische Resistenz der so erhaltenen Suspension wurde parallel mit zwei Kontrollsuspensionen verfolgt, deren eine die gleiche Strahlendosis erhalten hatte, aber nicht zentrifugiert worden war (Suspension II), während die andere unbestrahlt war (Suspension I). Bild 3 zeigt einen solchen Versuch. Die bestrahlte Kontroll-

suspension II zeigt rasche Resistenzänderung in gleicher Weise wie das Blut in Bild 1b und Bild 2b, c, d. Die beiden Suspensionen I und III mit unbestrahltem Blut dagegen ändern ihre Resistenz nur sehr langsam. Dabei beobachtet man aber zwischen I und III gar keinen Unterschied. Der geringe Grad von Kationenpermeabilität in diesen beiden Suspensionen ist praktisch gleich. Das Zentrifugat III aus der bestrahlten Suspension enthält also keinen hämolysierenden Stoff. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt, wobei nicht nur die Zeit zwischen Bestrahlung und Zentrifugieren variiert wurde (0, 10, 24, 48 und 72 Stunden), sondern auch die Temperatur in der Nachperiode (5° C und 37° C). Nie trat zwischen der Suspension III und der Kontrollsuspension I ein Unterschied auf.

Worauf die Diskrepanz zwischen unseren und Koeppes Versuchen beruht, soll nicht diskutiert werden. Vielleicht würden weitere Versuche zeigen, daß unter irgendwelchen Abweichungen von unseren Versuchsbedingungen ein hämolysierender Stoff doch nachweisbar wird. Uns liegt es nicht daran, nachzuweisen, daß es solche hämolysierende Stoffe nicht gibt, sondern zu zeigen, daß der Mechanismus der Ultravioletthämolyse nichts mit solchen Stoffen zu tun hat, d. h. daß die Strahlen unmittelbar an der Zelle angreifen. Dieser Schluß ergibt sich aus unseren Versuchen eindeutig. Unter unseren Versuchsbedingungen, bei denen eine starke, quantitativ faßbare Ultravioletthämolyse erreicht wird, läßt sich ein hämolytischer Stoff auch nicht in Spuren nachweisen. Dabei ist noch zu betonen, daß die quantitative Erfassung des Hämolysegrades, wie sie photoelektrisch möglich ist, erheblich präzisere Aussagen gestattet als eine makroskopische Betrachtung. Wir können also mit Sicherheit aussagen, daß die Strahlenwirkung, die die Ultravioletthämolyse auslöst, unmittelbar an der Zellmembran angreift.

4. Die Abhängigkeit der Ultravioletthämolyse vom Salzmilieu

A. Bestrahlungsperiode und Nachperiode

Auch die Ultravioletthämolyse hängt von der Art der anwesenden Ionen ab. Auch hier läßt sich wie bei der Röntgenhämolyse zeigen, daß es nur die Ionen während der Nachperiode sind, auf die es ankommt, während den bei der Bestrahlung selbst anwesenden Ionen keine Bedeutung zufällt. Der Nachweis wurde folgendermaßen geführt: Blut wurde wie gewöhnlich in 25proz. Suspension bestrahlt, und zwar eine Probe in isotonischer Kaliumrhodanid-, eine andere in Kaliumchloridlösung. Nach der Bestrahlung wurde von beiden Suspensionen je eine Hälfte mit isotonischer Kaliumrhodanidlösung 1:10, die andere mit isotonischer Kaliumchloridlösung 1:10 verdünnt, bei 6° C aufbewahrt und fortlaufend

osmotisch untersucht. Auf diese Weise erhielten wir vier Suspensionen, von denen zwei Paare sich untereinander nur im Salz der Bestrahlungsperiode unterschieden, während eine entsprechende andere Zuordnung zwei Paare ergab, die sich untereinander nur im Salz der Nachperiode unterschieden. Das Salz der Bestrahlungsperiode wurde zwar bei der Verdünnung nicht entfernt, aber seine Konzentration wurde dabei so stark herabgesetzt, daß es, wie die Versuche zeigen, auf die Resistenzänderung nicht mehr von Einfluß ist. In Bild 4 ist ein solcher Versuch wiedergegeben. Die Suspensionen mit gleichem Salz in der Nachperiode verhalten sich praktisch gleich, unabhängig davon, in was für einer Lösung

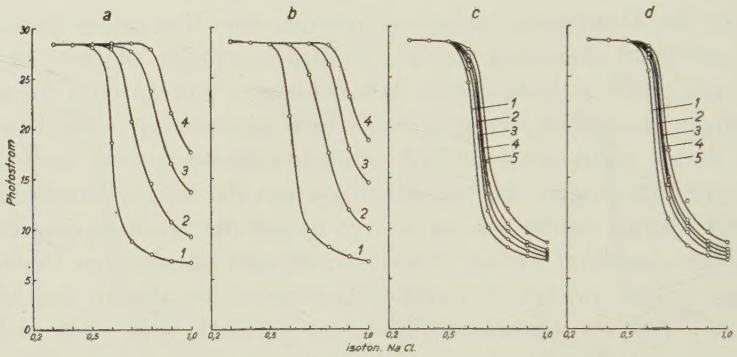

Bild 4. Einflußlosigkeit der während der Bestrahlungszeit anwesenden Ionen: Änderung der osmotischen Resistenz bestrahlten Blutes in der Nachperiode (2stündige Bestrahlung):

a) Bestrahlung in KCl, Suspension in KSCN
b) Bestrahlung in KSCN, Suspension in KSCN (isotonische Lösungen)
c) Bestrahlung in KCl, Suspension in KCl
d) Bestrahlung in KSCN, Suspension in KCl

Zeiten: Kurve Nr.	1	2	3	4	5	
	1/2	7	14	20	45	Stunden

sie bestrahlt wurden, während zwischen Suspensionen mit verschiedenen Salzen in der Nachperiode beträchtliche Unterschiede in der Schwellungsgeschwindigkeit auftreten. Diese Unterschiede sind aber auch wieder unabhängig davon, in welcher Lösung die Suspension bestrahlt worden war.

Die während der Bestrahlung anwesenden Ionen sind also offenbar für die Schwellungsgeschwindigkeit bedeutungslos und der Grad der Kationenpermeabilität wird somit nur durch die Ionen der Nachperiode bestimmt. In den folgenden Versuchen über den Einfluß verschiedener Salze wurden daher jeweils die Ionen nur in der Nachperiode variiert, während das Blut immer in gleicher Suspension bestrahlt wurde (25proz. in isotonischer Kochsalzlösung).

B. Die Ionenreihen

Variiert man die Ionen während der Nachperiode, so ergeben sich charakteristische Ionenreihen, die mit den bei der Röntgenhämolyse gefundenen weitgehend übereinstimmen. Als Salze mit gleichem Anion, aber verschiedenen Kationen, wurden KCl, NaCl, LiCl, $BaCl_2$, $CaCl_2$ und

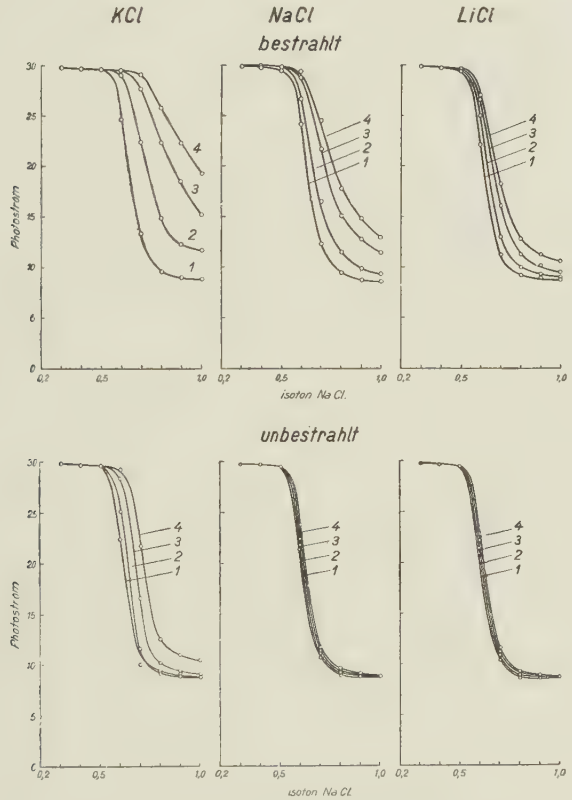

Bild 5. Permeationsgeschwindigkeit verschiedener einwertiger Kationen: Zeitlicher Verlauf der osmotischen Schwellung unbestrahlten und bestrahlten Blutes in isotonischer KCl-, NaCl-, LiCl-Lösung (gleiches Anion, aber verschiedene einwertige Kationen). Zweistündige Bestrahlung.

Zeiten:	Kurve Nr.	1	2	3	4	
		1	24	69	120	Stunden

$MgCl_2$ gewählt. Bild 5 und 6 zeigen die Ergebnisse. Von den einwertigen Kationen (Bild 5) beschleunigt Kalium die Schwellung am stärksten, Natrium schwächer und Lithium am schwächsten, d. h. es ergibt sich die Reihe der Diffusionsgeschwindigkeiten. Da das Eindringen der Kationen der limitierende Faktor für die Schwellungsgeschwindigkeit ist, dürfte

diese Reihe der einwertigen Kationen im wesentlichen ihre Permeationsgeschwindigkeit wiedergeben und nicht einen Einfluß auf die Membranpermeabilität.

Diese Deutung wird weiter gestützt durch das Verhalten der zweiwertigen Kationen, das in Bild 6 wiedergegeben ist. In isotonischen

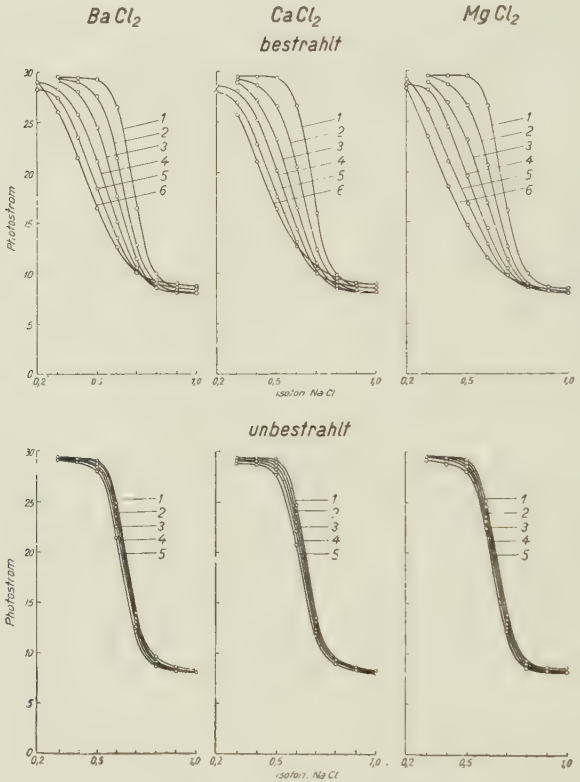

Bild 6. Permeationsgeschwindigkeit verschiedener zweiwertiger Kationen: Zeitlicher Verlauf der osmotischen Schwellung unbestrahlten und bestrahlten Blutes in isotonischer $BaCl_2$-, $CaCl_2$-Lösung (gleiches Anion, aber verschiedene zweiwertige Kationen). Zweistündige Bestrahlung.

Zeiten: Kurve Nr	1	2	3	4	5	6	
	1	14	28	52	87	133	Stunden

Lösungen von $BaCl_2$, $CaCl_2$ und $MgCl_2$ erfolgt keine osmotische Schwellung und keine Hämolyse. Bezöge sich diese Wirkung auf die Membran im Sinne einer Herabsetzung der Kationenpermeabilität, so müßte die Resistenz unverändert bleiben. Handelt es sich dagegen darum, daß die bestrahlte Membran zwar für die kleinen einwertigen Kationen schon durchlässig

ist, für die zweiwertigen dagegen noch nicht, so muß Salz austreten und die Resistenzkurve sich nach links verschieben. Das ist tatsächlich in allen drei Lösungen beim bestrahlten Blut sehr deutlich der Fall, während beim unbestrahlten eine Änderung in der gleichen Richtung zwar erkennbar, aber außerordentlich langsam ist. Die Wirkung der zweiwertigen Kationen ist also nicht eine Permeabilitätsänderung, sondern beruht auf ihrer geringen Permeationsfähigkeit. Es ist daher wahrscheinlich, daß auch die einwertigen Kationen die Schwellungsgeschwindigkeit im wesentlichen nur durch die Diffusionsgeschwindigkeit beeinflussen.

Eine Sonderstellung des Calciums, wie sie in den Versuchen der ersten Mitteilung über Röntgenhämolyse (Liechti und Wilbrandt 1941) beobachtet wurde, fand sich hier nicht. Es ist aber unwahrscheinlich, daß darin ein Unterschied zwischen Röntgen- und Ultravioletttstrahlenwirkung liegt. Dagegen spricht vor allem die Tatsache, daß die Diskrepanz auch in den Kontrollversuchen mit unbestrahltem Blut besteht; denn während das unbestrahlte Blut bei den hier mitgeteilten Versuchen seine Resistenz in 87 Stunden kaum merkbar in der Richtung der Schrumpfung ändert, war in den erwähnten Versuchen der früheren Mitteilung schon nach 6 Stunden die Schrumpfung wesentlich stärker und nach 24 Stunden beträchtlich. Da damals Menschenblut und jetzt Rinderblut verwendet wurde, haben wir den Versuch mit unbestrahltem Menschenblut parallel mit einem Rinderblutversuch wiederholt und gefunden, daß Menschenblutkörperchen in der Tat deutlich rascher schrumpfen als Rindererythrozyten. Die Schrumpfung erreichte aber weder bezüglich Ausmaß noch bezüglich Geschwindigkeit die gleichen Werte wie in der ersten Mitteilung. Hier sind weitere Versuche erforderlich.

Im Gegensatz zu den Kationen können die Anionen die Schwellungsgeschwindigkeit auf Grund ihres verschiedenen Diffusionsvermögens nicht beeinflussen, weil, wie oben gezeigt, die Kationendiffusion limitierender Faktor ist. Unterschiede zwischen verschiedenen Anionen sind daher auf Änderung der Membranpermeabilität zu beziehen. Solche Unterschiede sind wie bei der Röntgenhämolyse sehr ausgesprochen vorhanden. Bild 7 zeigt Versuche mit Kaliumsalzen verschiedener Säuren. Salizylat und Rhodanid beschleunigen die Schwellung am stärksten, schwächer Nitrat und noch schwächer Chlorid. In Sulfatlösung erfolgt überhaupt keine Schwellung, sondern im Gegenteil Schrumpfung, und zwar bei bestrahltem und unbestrahltem Blut mit etwa gleicher Geschwindigkeit. Diese Schrumpfung erfolgt durch den Anionenaustausch SO_4Cl (siehe Liechti und Wilbrandt 1941). Zu Kationenpermeabilität kommt es offenbar in Sulfatlösung überhaupt nicht.

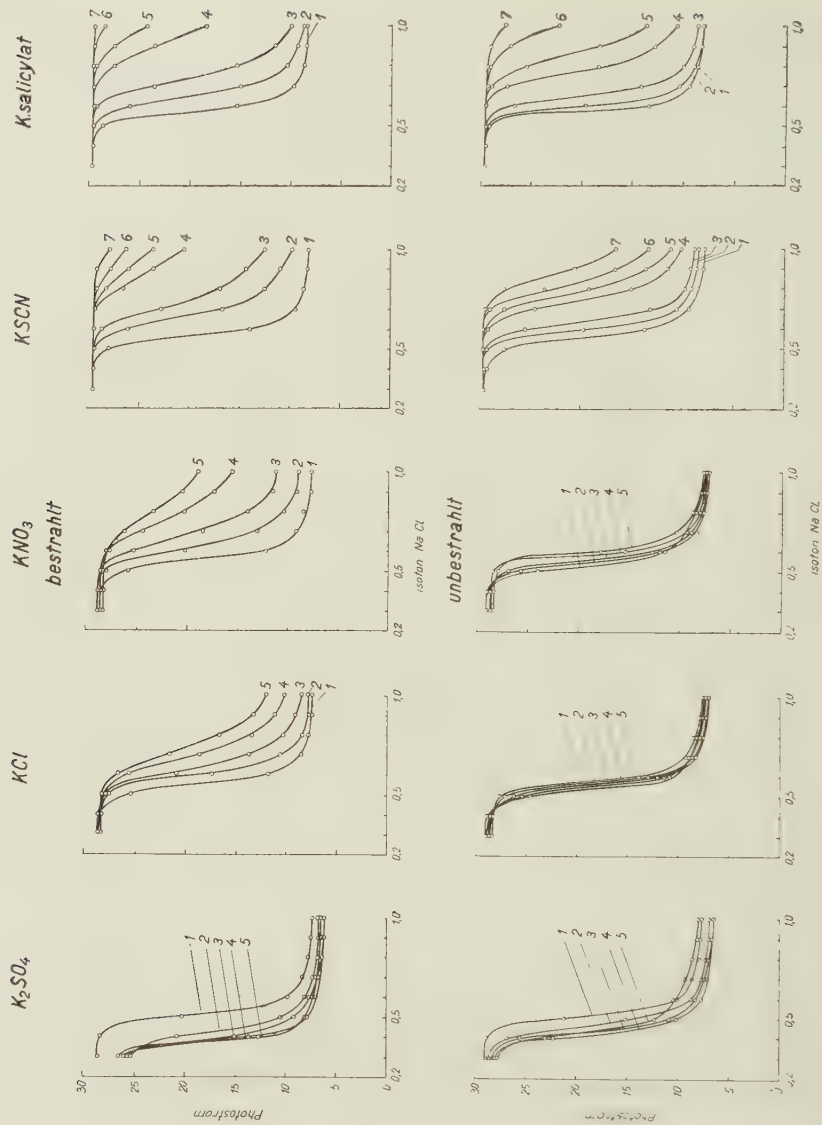

Bild 7. Wirkung verschiedener Anionen: Zeitlicher Verlauf der osmotischen Schwellung unbestrahlten und bestrahlten Blutes in isotonischer K_2SO_4-, KCl-, KNO_3-, KSCN- und K-Salizylatlösung (gleiches Kation, aber verschiedene Anionen). Zweistündige Bestrahlung.

Zeiten für K_2SO_4, KCl und KNO_3:

Kurve Nr.	1	2	3	4	5	
	1	10	24	52	80	Stunden

Zeiten für KSCN und K-Salizylat:

Kurve Nr.	1	2	3	4	5	6	7
	2/3	4	8	19	25	33	44 Stunden

C. Der quantitative Bestrahlungseffekt in verschiedenen Salzlösungen

Sowohl die Reihenfolge der Anionenwirkungen als auch die Tatsache, daß in Sulfat gar keine Kationenpermeabilität entsteht, stimmt mit der Erfahrung an röntgenbestrahltem Blut überein. Ebenso sind auch die quantitativen Beziehungen zwischen der Schwellungsgeschwindigkeit des bestrahlten und des unbestrahlten Blutes im wesentlichen bei Röntgen- und bei Ultraviolettbestrahlung gleich. Das zeigt Bild 8, in welchem Zeitkurven der Schwellung in den verschiedenen Salzlösungen wiedergegeben sind. Hierbei wurden nur die photometrischen Ablesungswerte in 0,6 isotonischer Kochsalzlösung benutzt und gegen die Zeit aufgetragen. Der Unterschied zwischen bestrahltem und unbestrahltem Blut ist unter den einwertigen Anionen am größten bei Cl, etwas kleiner bei NO_3 und am kleinsten bei SCN. Nimmt man als Maß der Schwellungsgeschwindigkeit den reziproken Wert der Zeit bis zu einer bestimmten Photometerablesung und vergleicht diesen für je eine Salzlösung bei bestrahltem und unbestrahltem Blut, so erhält man folgende Zahlen, denen wegen des nicht völlig gleichen Kurvenverlaufs in den beiden Suspensionen zwar keine quantitativ exakte Bedeutung zukommt, die aber zweifellos die Reihenfolge der Beschleunigung richtig wiedergeben:

Photostromablesung	Reziproker Wert der Zeit in Stunden		Verhältnis
	bestrahlt	unbestrahlt	
Salizylat 26	$^1/_4$	$^1/_7$	1,7
Rhodanid 26	$^1/_6$	$^1/_{20}$	3,3
Nitrat 18	$^1/_7$	$^1/_{85}$	12,0
Chlorid 14	$^1/_3$	$^1/_{85}$	28,0

Die Beschleunigung durch die Bestrahlung ist also in Chloridlösung 28fach, in Nitratlösung 12fach, in Rhodanidlösung 3,3fach und in Salizylatlösung nur 1,7fach. D. h. in denjenigen Salzlösungen, in denen die Schwellung unbestrahlter Blutzellen am geringsten ist, wirkt sich die Bestrahlung am stärksten aus, während die Wirkung stärker permeabilitätsändernder Salze durch die Bestrahlung nur noch wenig verstärkt wird. Das zweiwertige Sulfatanion schließlich durchbricht diese Regel, indem in Sulfatlösung weder unbestrahlte noch bestrahlte Erythrozyten schwellen. Daraus ergibt sich, daß auch die Ultraviolettbestrahlung wie die Röntgenbestrahlung die Erythrozytenpermeabilität nicht unmittelbar

verändert, sondern die Membran nur gegen die Wirkung der Anionen sensibilisiert. Sind nur unwirksame Sulfatanionen vorhanden, so bleibt auch beim bestrahlten Blut die Permeabilitätsänderung ganz aus.

D. Die Reversibilität der Ionenwirkung

Die Wirkung der Ionen ist reversibel. Läßt man ultraviolettbestrahltes Blut abwechselnd in Lösungen verschiedener Salze schwellen, so stellt sich jeweils nach dem Lösungswechsel die Schwellungsgeschwindigkeit sofort auf den Wert um, der für die neue Salzlösung typisch ist. Bild 9 zeigt je einen Versuch für zwei kationen- wie für zwei anionengleiche

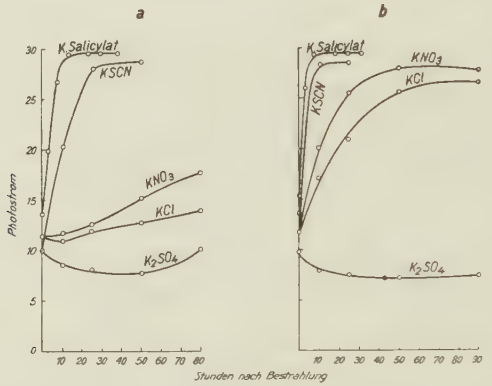

Bild 8. Zeitlicher Verlauf der Schwellung in verschiedenen Salzlösungen: Ordinate: Photometrische Ablesung in 0,6 isotonischer NaCl-Lösung. Abszisse: Zeit in Stunden:
a) unbestrahltes Blut
b) bestrahltes Blut (zweistündige Bestrahlung).

Salzlösungen. Im ersten Versuch (Wechsel der Anionen, siehe Bild 9a) wurde bestrahltes Blut zunächst in Kaliumrhodanidlösung suspendiert, dann nach 3 Stunden die Hälfte dieser Suspension zentrifugiert, die überstehende Lösung abgesogen und durch isotonische Chloridlösung ersetzt. Nach weiteren 3 Stunden wurde die Hälfte dieser Chloridsuspension ihrerseits zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgesogen und durch isotonische Rhodanidlösung ersetzt. Nach jedem Wechsel der Suspensionslösung stellt sich die Schwellungsgeschwindigkeit sofort um, während die nicht gewechselte Suspensionshälfte mit der bisherigen Geschwindigkeit weiter schwillt. Genau das gleiche Resultat erhält man mit Kaliumchlorid und Lithiumchlorid (Wechsel der Kationen, Bild 9b).

Für die Kationen ist die Reversibilität aus ihrer Wirkung als verschieden schnell diffundierende Teilchen durchaus zu erwarten, während sie

bei den Anionen, die auf die Membranpermeabilität einwirken, nicht selbstverständlich ist. Bild 9a zeigt, daß die Permeabilitätsänderung durch die Anionen reversibel ist. Sie stützt damit auch weiter die Annahme, daß die Anionen die Permeabilität durch Denaturierung von Membraneiweiß beeinflussen, da auch für die Eiweißdenaturierung durch Anionen Reversibilität gezeigt worden ist (Anson und Mirsky 1934). Auch hier besteht Übereinstimmung mit den Verhältnissen bei der Röntgenhämolyse und bei unbestrahltem Blut.

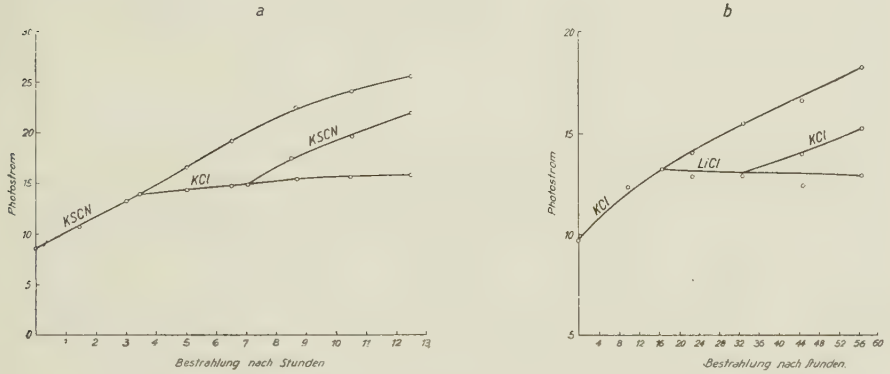

Bild 9. Die Reversibilität der Ionenwirkung:
Ordinate: Photometrische Ablesung in 0,9 isotonischer NaCl-Lösung, bei wiederholtem Wechsel der Suspensionsflüssigkeit.
Abszisse: Zeit in Stunden:
a) Wechsel des Anions
b) Wechsel des Kations. (Näheres siehe im Text.)

5. Die Abhängigkeit der Ultravioletthämolyse von der Temperatur

In der ersten Mitteilung über Röntgenhämolyse (Liechti und Wilbrandt 1941) war gezeigt worden, daß die Temperaturabhängigkeit der Schwellungsgeschwindigkeit nur im höheren Temperaturbereich den Erfahrungen entspricht, die über die Temperaturabhängigkeit der Zellpermeabilität gesammelt worden sind. Nur zwischen 20 und 37° C erhält man Zunahme der Schwellungsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur, während bei 6° C die Schwellungsgeschwindigkeit größer ist als bei 20° C und sogar größer sein kann als bei 37° C. Diese Beobachtung wurde so erklärt, daß die Wirkung der Ionen auf die Membranpermeabilität auf einer Ionenadsorption an die Membran beruht, und daß im Adsorptionsgleichgewicht bei tieferer Temperatur die Menge der adsorbierten Substanz erhöht ist.

Auch bei der Ultravioletthämolyse besteht die gleiche Temperaturabhängigkeit. Bild 10 zeigt Versuche bei 6, 18 und 37° C, und zwar eine Reihe mit unbestrahltem Blut in Kaliumrhodanidlösung (a), eine mit bestrahltem Blut in Kaliumrhodanidlösung (b) und eine mit bestrahltem Blut in Kaliumchloridlösung (c). Beim Rhodanid ist die Schwellungsgeschwindigkeit bei 6 und 37° C etwa gleich und bei beiden Temperaturen deutlich größer als bei 18° C. Diese Beziehung besteht sowohl beim bestrahlten wie beim unbestrahlten Blut und hängt also nicht von der Bestrahlung, sondern von der Ionenart ab. Beim Chlorid ist zwar auch die Geschwindigkeit bei 18° C am kleinsten, aber bei 6 und 37° C sind die Geschwindigkeiten nicht gleich, sondern die Blutkörperchen schwellen bei 37° C deutlich schneller.

Dieser Unterschied zwischen den beiden Salzen steht mit der Adsorptionsdeutung in guter Übereinstimmung. Die Adsorbierbarkeit der verschiedenen Ionen ist nicht gleich, sondern stuft sich nach der lyotropen Ionenreihe ab. Das war ja einer der Gründe, die für die Bedeutung einer Ionenadsorption bei der Röntgenhämolyse sprachen, da die Beeinflussung der Hämolysegeschwindigkeit der gleichen Reihe folgt. Wenn nun Chlorid schlechter adsorbiert wird als Rhodanid, dann ist zu erwarten, daß die kinetische Energie der Ionen bei Chlorid stärker herabgesetzt werden muß als bei Rhodanid, um adsorptive Fixierung zu ermöglichen, d. h. daß das Temperaturminimum der Hämolysegeschwindigkeit bei tieferer Temperatur liegen muß. Das ist nun, wie Bild 10 zeigt, tatsächlich der Fall.

Es sei zudem darauf hingewiesen, daß die Wirkung der Temperatursenkung noch größer sein muß, als es nach Bild 10 zunächst scheint. Wenn nämlich Bild 10a und b den Anschein erwecken, als sei die Permeabilität bei 37 und 6° C gleich, so ist dazu folgendes zu bemerken. Gleich sind die Schwellungsgeschwindigkeiten. Damit aber bei 6 und 37° C gleiche Schwellungsgeschwindigkeit resultieren kann, muß die Permeabilität bei 6° C sehr beträchtlich höher sein als bei 37° C, denn die Ionen-

---

Bildunterschrift von nebenstehender Seite:

Bild 10. Abhängigkeit der Ultravioletthämolyse von der Temperatur: Geschwindigkeit der Resistenzänderung von unbestrahltem (a) und bestrahltem (b) Blut, suspendiert in KSCN-Lösung und von bestrahltem Blut, suspendiert in KCl-Lösung (c) bei 6° C, 18° C und 37° C. Zweistündige Bestrahlung.

Zeiten für das in KSCN suspendierte Blut:

Kurve Nr.	1	2	3	4	
	$^3/_4$	5	10	20	Stunden

Zeiten für das in KCl suspendierte Blut:

Kurve Nr.	1	2	3	4	5	6	7	9	
	1	14	23	31	39	53	70	98	Stunden

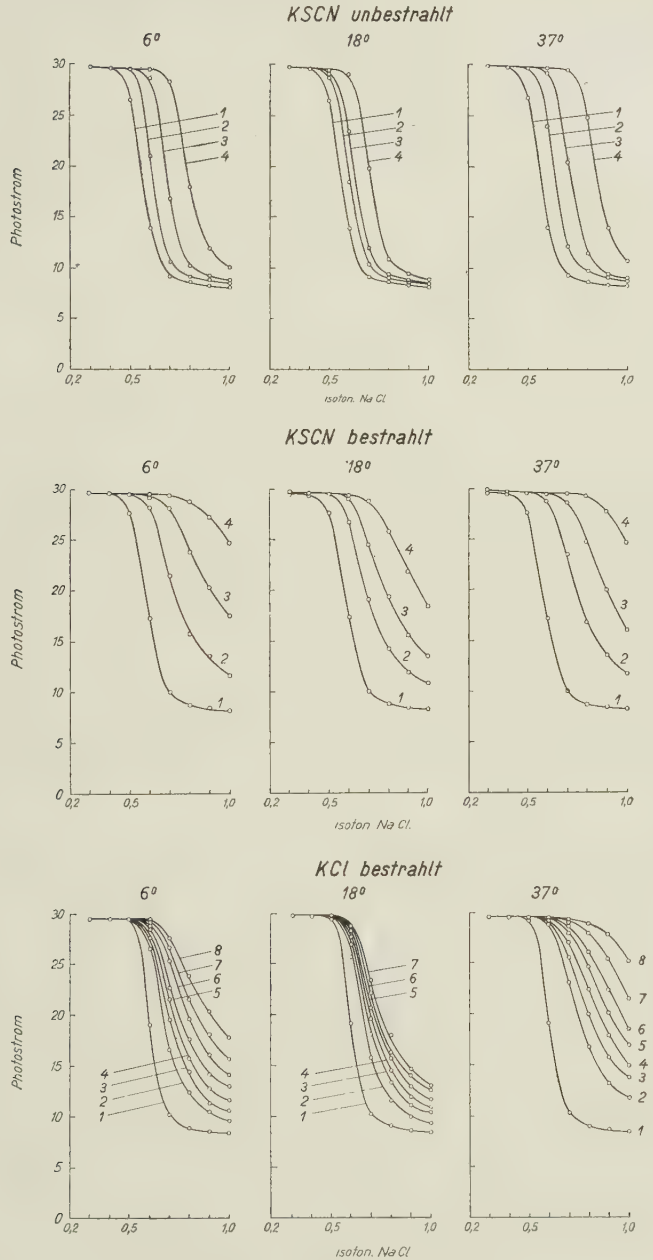
KSCN unbestrahlt
6°
18°
37°
Photostrom
isoton. Na Cl
KSCN bestrahlt
6°
18°
37°
Photostrom
isoton. Na Cl
KCl bestrahlt
6°
18°
37°
Photostrom
isoton. Na Cl

Bild 10

diffusion durch die Zellmembran hat einen beträchtlichen Temperaturkoeffizienten. Die Temperatur beeinflußt dabei nach Danielli (1937) nicht die Membranstruktur, sondern die diffundierenden Moleküle im Sinne einer „Aktivierung" analog dem von der chemischen Reaktivität bekannten Begriff. Unter „Permeabilität" ist daher bei der vorliegenden Betrachtung nur die strukturelle Eigenschaft der Membran zu verstehen, sozusagen die „auf gleiche Temperatur reduzierte ‚Permeabilität'". Daß ein Temperaturminimum überhaupt entsteht, beruht ja nach unserer Deutung auf der Kreuzung zweier gegenläufiger Temperaturkurven, derjenigen der Membrandiffusion und derjenigen der Ionenadsorption.

IV. Diskussion

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit kann im wesentlichen kurz dahin zusammengefaßt werden, daß alle in der Einleitung erwähnten Eigentümlichkeiten der Röntgenhämolyse sich bei der Ultravioletthämolyse wiederfinden. Eine Aufzählung der gemeinsamen Züge der beiden Hämolysen würde nur eine Wiederholung der Einleitung bedeuten, so daß darauf verzichtet werden kann.

Der Schluß, zu dem diese völlige Übereinstimmung zwingt, ist, daß beide Hämolysen auf dem gleichen Mechanismus beruhen. Wie bei der Röntgenhämolyse ist als unmittelbare Wirkung auf die Zellmembran auch bei der Ultravioletthämolyse eine Denaturierung von Membraneiweiß anzunehmen. Die aus Versuchen in vitro bekannte Fähigkeit der Ultraviolettstrahlen, Eiweiß zu denaturieren, gibt dieser Annahme eine weitere Stütze.

In zwei Punkten ergibt die Arbeit darüber hinaus aber auch Resultate, die für die Theorie der Strahlenwirkung Neues bringen:

Der eine bezieht sich auf die Abschrägung der Resistenzkurven, die als Ausdruck einer Streuung der Schwellungsgeschwindigkeit gedeutet wurde. Auch in den Versuchen der vorliegenden Arbeit findet sich, wie schon im ersten Abschnitt erwähnt, diese Abschrägung fast regelmäßig. Die Abschrägung ist im allgemeinen bei den bestrahlten Suspensionen größer als bei den unbestrahlten. In vielen Kontrollsuspensionen ohne Bestrahlung ist die Verschiebung der Resistenzkurven fast streng parallel, während in den zugehörigen bestrahlten Suspensionen eine deutliche Abschrägung auftritt. Das gilt besonders für die rasch hämolysierenden Lösungen von Kaliumsalizylat und Kaliumrhodanid (siehe z. B. Bild 10). Daraus ergibt sich nun, daß die Streuung erst durch die Bestrahlung eingeführt wird und wohl auf einer Variabilität der Strahlenresistenz beruht.

Das zweite neue Ergebnis ist die Beobachtung, daß das Temperaturminimum der Schwellungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Salzen verschiedenenen Wert besitzt. Sie bildet, wie oben auseinandergesetzt, eine weitere Stütze für die Annahme der Ionenadsorption. Es wäre von Interesse, solche Versuche auf andere Ionen der lyotropen Reihe auszudehnen.

Bezüglich der Verwendung des Ausdrucks „Adsorption" sei hier nochmals betont, worauf schon in der vorhergehenden Mitteilung hingewiesen wurde, daß über die Art der Bindung der „adsorbierten" Moleküle zunächst gar nichts ausgesagt werden soll. Es muß sich nur, wenn unsere Anschauungen über den Einfluß der Temperatur richtig sind, um Bindungen handeln, deren freie Energie in der Größenordnung der kinetischen Energie der Moleküle liegt, also um sehr lockere Bindungen mit kleiner Bindungsenergie.

V. Zusammenfassung

1. Die Ultravioletthämolyse ist eine osmotische Hämolyse, die dadurch zustande kommt, daß die bestrahlten Erythrozyten kationenpermeabel werden und infolgedessen in Salzlösung durch Salzeintritt bis zur Hämolyse schwellen. In Saccharoselösung tritt daher keine Hämolyse ein.

2. Der Grad der Kationenpermeabilität steigt mit zunehmender Strahlendosis.

3. Die Strahlenwirkung greift direkt an der Zellmembran an. Die Bildung eines Hämolysins durch die Bestrahlung ließ sich nicht nachweisen. Die Ultravioletthämolyse wird nicht durch einen hämolysierenden Stoff ausgelöst.

4. Die Geschwindigkeit der Ultravioletthämolyse hängt von den während der Nachperiode anwesenden Ionen ab. Die Ionen während der Bestrahlung sind ohne nachweisbaren Einfluß.

5. Die einwertigen Kationen wirken nach der Reihe $K > Na > Li$, entsprechend der Geschwindigkeit ihres Eindringens in die Zellen. Ca, Ba und Mg dringen auch in bestrahlte Erythrozyten nicht ein, so daß es in Chloridlösungen dieser Kationen nicht zu Hämolyse kommt.

6. Die Anionen wirken auf die Membranpermeabilität entsprechend der Reihe $SO_4 < Cl < NO_3 < SCN$ Salizylat. In Sulfatlösung tritt gar keine Kationenpermeabilität und daher auch keine osmotische Schwellung oder Hämolyse ein. Bei den einwertigen Anionen folgt die quantitative Bestrahlungswirkung, d. h. die Beschleunigung der osmotischen Schwellung durch die Bestrahlung der Reihe Salizylat $SCN < NO_3 < Cl$, sie ist also am kleinsten bei den Ionen, die am unbestrahlten Blut am stärksten wirken und umgekehrt.

7. Die Wirkung der Kationen und Anionen ist reversibel.

8. Die Geschwindigkeit der Hämolyse hat ein Temperaturminimum in der Gegend von 20° C.

9. In allen unter 1 bis 8 genannten Punkten stimmt die Ultraviolett-hämolyse mit der Röntgenhämolyse überein. Das zwingt zu dem Schluß, daß die beiden Hämolysen auf dem gleichen Mechanismus beruhen: Kationenpermeabilität infolge Denaturierung von Membraneiweiß durch adsorbierte Anionen, nach Sensibilisierung der Membran durch die Bestrahlung.

10. Das Temperaturminimum der Schwellungsgeschwindigkeit liegt in Chloridlösung tiefer als in Rhodanidlösung, was eine neue Stütze für die Adsorptionsannahme bildet.

*

Dem Eidgenössischen Gesundheitsamt und dem Vorstand der Liga für Krebsbekämpfung sprechen wir für die materielle Unterstützung unseren besten Dank aus.

Schrifttum

Anson u. Mirsky, J. gen. Physiol. 17 (1934): 399. — Brooks, S. C., J. gen. Physiol. 1 (1919): 61. — Bühlmann, A., A. Liechti u. W. Wilbrandt, Strahlenther. (im Druck, 1942). — Danielli, J. F., Trans. Far. Soc. 33 (1937) 1139. — Davson, H., Biochem. J. 33 (1939): 389. — Giaume, C., u. S. Poulon, Pathologica (Genova) 21 (1929): 474. Ref. Radiologie 8, 8. — Koeppe, H., Strahlenther. 23 (1926): 671. — Liechti, A., u. W. Wilbrandt, Strahlenther. 70 (1941): 545. — Rajewsky, Strahlenther. 29 (1928): 759; 31 (1929): 253; 33 (1929): 362; 34 (1929): 582; 37 (1930): 788. — Steinmann, R. M., u. W. Wilbrandt, Z. klin. Med. (im Druck, 1942). — Wilbrandt, W., Pflügers Arch. 241 (1938): 289; 243 (1940): 537; 245 (1941): 22.